



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Gerichtsmedizinischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Spann

Die lösliche GPT -
Bestimmungstechnik und populationsgenetische
Untersuchungen in Niederbayern sowie deren
Bedeutung in forensischer Sicht

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sigrid Woll

aus

Regensburg

im Jahre 1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. J.Jungwirth

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W.Spann

Dekan: Prof. Dr. med. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.Mai.1973



Mit der Veröffentlichung LANDSTEINERS (26) "Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute" im Jahre 1901 wurde das Fundament zur Erforschung weiterer menschlicher Blutkörperchen - und Serumeigenschaften gelegt. Bei den ABO-Gruppen handelt es sich um individuelle charakteristische über Generationen unveränderliche Eigenschaften, die den MENDEL'schen Vererbungsgesetzen folgen, und zwar auf der Basis der multiplen Allelie (BERNSTEIN 1925, 4, LATTES 1925, 29).

Aber nicht nur die Erythrozyten enthalten Blutgruppensubstanzen, sondern auch Sperma und Speichel (YMAKAMI, LANDSTEINER, LEVINE 1926, 53). Vier Jahre später beobachteten LEHRS und PUTKONEN (30), daß es sich bezüglich des Speichels nicht um eine obligate Eigenschaft handele, sondern daß es Ausscheider (Sekretoren Se) und Nichtausscheider (Nonsekretoren se) gibt. Zwischen diesem System und einem weiteren Blutgruppensystem - nämlich dem Lewis-System (MOURANT 1946, 36) - besteht Kopplung in der Weise, daß Nonsekretoren immer das Merkmal Le^a besitzen (GRUBB 1948, 15).

1927 stellten LANDSTEINER und LEVINE (27) einen von den ABO-Gruppen unabhängigen Antikörper fest und konnten somit eine neue Ery-Eigenschaft aufzeigen. Weitere Untersuchungen führten zum MN-System, von dem bereits heute wieder Untergruppen bekannt sind.

WALSH und MONTGOMERY 1947 (51) eruierten bei einer graviden Frau, die nach der fünften Schwangerschaft ein mazeriertes Kind geboren hatte einen Antikörper, der keine Beziehung zu bisher bekannten hatte. Schon ein Jahr später

konnten sie zusammen mit SANGER und RACE (52) einen Zusammenhang mit dem MN-System feststellen. Das neue System (S,s) ist mit dem MN-System vergesellschaftet und bildet vier Hauptgene: MS, NS, Ms, Ns. Noch im gleichen Jahr (1927) stiessen LANDSTEINER und LEVINE (27) auf den P-Faktor. Auch er ist heute durch eine Reihe von Untergruppen charakterisiert.

Die Entdeckung des Rh-Systems während des zweiten Weltkrieges durch LANDSTEINER und WIENER 1940 (28) brachte im Transfusionswesen enorme Fortschritte. Sie konnten zeigen, daß mit *Macacus-rhesus*-Erythrozyten immunisierte Meerschweinchen - und Kaninchenserum 85 % menschlicher Blutmuster der weißen Rasse zu agglutinieren vermögen. Ein Jahr später erkannten LEVINE et al. (31) den Zusammenhang zwischen Erythroblastose und dem Rhesussystem. Heute sind sechs Hauptantigene bekannt: C, c, D, (d hypothetisch) E, e und deren Varianten C^W , C^N , D^U , E^W , (E^U) , e^S .

Die Suche nach weiteren irregulären Antikörpern, die häufig eine hämolytische Anämie oder Aborte zur Folge hatten, führte zum Anti-Kell (COOMBS, MOURANT, RACE 1946, 9). Das entsprechende Antigen K hat eine verhältnismäßig starke Antigenität. Auch das antithetische Antigen Cellano (k) wurde bald gefunden (LEVINE, BACKER, WIGOD, PONDER 1949, 32). Das Lutheran-Merkmal 1946 von CALLENDER und RACE (8), sowie das Duffy-System (CUTBUSH, MOLLISON und PARKIN 1950, 10) verdienen ebenso wie das Kidd-System (ALLEN, DIAMOND, NIEDZIELA 1951, 1) besondere Beachtung, weil auch sie nicht selten zu Transfusionszwischenfällen und erythroblastotischen Krankheitsbildern führen können.

Der Nachweis der oben aufgeführten Blutgruppenmerkmale wird durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion erbracht. Der Reaktionsort liegt auf der Erythrozytenmembran. Das positive Reaktionsergebnis ist durch Agglutination gekennzeichnet.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Serumgruppen. WALLER und VAUGHAN 1956 (50), sowie MILGROM, DUBISKI und WOŹNICZKO 1956 (35) teilten mit, daß bestimmte Seren die Fähigkeit haben, beladene Erythrozyten zu präzipitieren. GRUBB und LAURELL (16) wiesen aber auch daraufhin, daß gewisse menschliche Seren die "Agglutination" hemmen können. Dieser Hemmstoff gehört der Gruppe der Gammaglobuline an. Man benennt heute die häufigen Gene mit Gm (1,2,10). Auf dem gleichen Reaktionsprinzip liegt der Nachweis der Inv-Gruppen. 1960 wurde Inv a von ROPARTZ, LENOIR und RIVAT (41) und zwei Jahre darauf Inv l von ROPARTZ, RIVAT und ROUSSEAU (42) gefunden. Heute hat in der Vaterschaftsbegutachtung Inv l besondere Bedeutung erlangt.

Völlig anders ist der Nachweis der anderen Serumgruppen. Auf Grund ihrer verschiedenen Molekülgröße und ihrer elektrischen Ladung und biochemischen Aktivität ist es möglich, Seren auf einem Trägermedium aus Papier, Stärke, Polyakrylamid und dergleichen im elektrischen Feld zu trennen.

Schon im Jahre 1955 gelang SMITHIES die Trennung der Haptoglobintypen mit der Stärkegelelektrophorese. Noch im gleichen Jahr konnten er und WALKER (44) zeigen, daß die Haptoglobinemuster genetisch bedingte Punkte sind und den Erbgang als kodominanten an Hand von Familienstudien deuten. Eine Kombination der Elektrophorese mit der Gelpräzipitation ist 1959 von HIRSCHFELD (19) als Nachweismethode der Gc-Gruppen beschrieben worden. Die drei Typen Gc 1-1, 2-1, 2-2 werden von zwei autosomalen Genen gesteuert. Die Trennung der Präalbumine (FAGERHOL und BRAEND 1965, 11) und der Transferine (SMITHIES 1956, 45) geschieht mittels Stärkeelektrophorese und anschließender Färbung der verschiedenen Fraktionen. Analog gelingt die Differenzierung der C'3-Gruppen (AZEN und SMITHIES 1968, 2), die mit den Posttransferrinen identisch sind, mittels Hochspannungs-Stärkeelektrophorese.

Aber nicht nur die Membran der Erythrozyten und die der Leukozyten (auf das HL-A-System wird hier nicht näher eingegangen), sowie die Serumweisgruppen zeichnen sich durch genetisch gesteuerte Vielförmigkeiten aus. Die Enzyme in den Erythrozyten sind wohl in sich identisch bezüglich ihres biochemischen Wirkungsmechanismus, jedoch polyform bezüglich Aktivitätsgradient, Größe und elektrischer Ladung, so daß ähnlich den Serumgruppen eine elektrophoretische Trennung der Fraktion möglich ist. Im allgemeinen bedient man sich der Stärkeelektrophorese. Die Sichtbarmachung der Enzymbanden geschieht durch Anbieten der auch in vivo notwendigen Reaktionspartner und durch eine anschließende Färbemethode.

HOPKINSON, SPENCER und HARRIS 1963 (21) leiteten mit der Trennung der sauren Erythrozytenphosphatase die genetische Untersuchung der Erythrozytenenzyme ein. Dieses Enzym wird von drei Genen gesteuert: P^a , P^b und P^c , wobei P^c eine sehr niedere Frequenz hat. Den homozygoten Typ C findet man äußerst selten, er hat nur eine Frequenz von 0,3 %. Der Erbgang dieses Enzyms als auch der folgenden ist kodominant autosomal. Bei Neugeborenen ist dieses Enzym bereits ausgebildet. Wegen der günstigen Genverteilung von $P^a = 0,3686$ und $P^b = 0,5744$ ist dieses Enzym für forensische Zwecke besonders geeignet.

Dagegen liegen die Verhältnisse bei der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (FILDES UND PARR 1963, 13) nicht so günstig. Zwei Gene $6-PGD^A$ und $6-PGD^B$ haben drei Phänotypen zur Folge, von denen der homozygote Typ $PGD^A PGD^A$ allein 95,9 % aller Typen bildet. Die beiden anderen Phänotypen, sowie drei weitere Sondertypen nehmen die übrigen 4,1 % ein.

SPENCER, HOPKINSON und HARRIS veröffentlichten 1964 eine Arbeit (20) über die Darstellung der genetischen Varianten der Phosphoglucomutase; hierbei wurde ein neues Enzym gefunden, das sich für gerichtsmedizinische Zwecke sehr gut eignet.

Die Darstellung ist standartisiert. Die drei Typen, die bei praktisch 100 % der europäischen Bevölkerung vorkommen, lassen sich sowohl mittels Stärkeelektrophorese als auch in neuerer Zeit durch Celluloseacetatfolien-Elektrophorese (SONNEBORN 1971, 46) gut differenzieren. Während bei den beiden oben angeführten Enzyme kein stummes Gen festgestellt wurde, konnten FIEDLER und PETTENKOFER 1968 den Genotyp PGM^0/PGM^0 durch fehlende Enzymaktivität nachweisen.

Im Jahre 1966 publizierten FILDES und HARRIS (12) die Erscheinung dreier Enzymmuster der Adenylatkinase (Ak), die zur Annahme von zwei autosomalen kombinanten Allelen führte. Weitere seltene Allele (Ak^3 und Ak^4) kommen vor (BOWMANN et al. 1967,5), haben aber im europäischen Raum nur geringe Bedeutung.

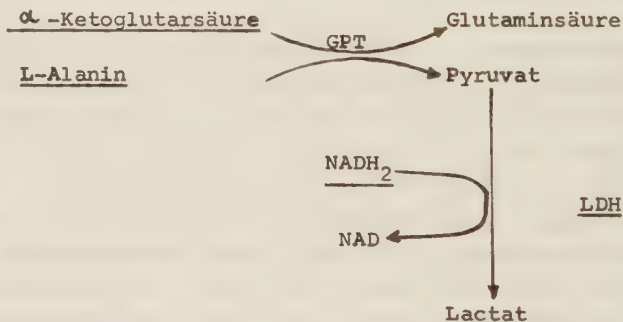
Heute wird meist zusammen mit der Adenylatkinase die Adenosindesaminase bestimmt, deren Polymorphismus zuerst SPENCER et al. 1968 (48) beschrieben hat. Wie bei allen bisher aufgezeigten Enzymen liegt auch hier ein kodominanter Erbgang vor. Das häufigste Allel ist ADA^1 mit 0,937.

CHEN und GIBLETT 1971 (6) veröffentlichten als erste einen morphologischen und quantitativen Polymorphismus der Glutamat-Pyruvat-Transaminase, der den Gesetzen der Genetik entspricht. Es wurden dabei drei Typen beobachtet: GPT 1-1, GPT 2-1, GPT 2-2. Man schloß daraus auf zwei Allele auf einem autosomalen Genlocus. KÖMPF 1971 (23, auch 24, 25) konnte die Beobachtung bestätigen und fand eine Genfrequenz von GPT 1 von $0,54 \pm 0,2$, während BENDER (3) eine Genfrequenz für GPT 1 von 0,52 ermitteln konnte. GUSSMANN und SCHWARZ-FISCHER 1972 (17,18) entdeckten noch ein drittes Allel und kamen zu folgenden Genfrequenzen: GPT^1 0,5041, GPT^2 0,4922, GPT^3 0,0035. Von CHEN (7) wurden 1972 abermals weitere drei Allele gefunden: GPT^4 , GPT^5 , GPT^6 , die jedoch nur in Afro-Amerika, auf den Philippinen und bei den Eskimos und den Indianern Kanadas vorkommen. Bei den Europiden wurden diese Allele bislang nicht gefunden.

Im Folgenden wird über die cytoplasmatische Form der Glutamyl-Pyruvat-Transaminase (GPT) in den Erythrozyten berichtet. Im menschlichen Genmuster sind bisher drei unabhängige GPT-Loci bekannt: der Locus A für die cytoplasmatische, lösliche Form, die Loci B und C für die mitochondriale - nachweisbar in Lymphozyten und Fibroblasten (3,34,45).

Dieses Enzym hat die Aufgabe, Aminogruppen von Aminosäuren auf Ketosäuren zu übertragen. Über diesen Weg wird die Aminogruppe dem Harnstoff-Zyklus zugeleitet, der die Elimination von Stickstoff als Harnstoff zur Folge hat.

Zum Nachweis der GPT-Banden werden die Substanzen angeboten, die das Enzym auch in vivo umsetzt, nämlich α -Ketoglutarinsäure und L-Alanin. KARLSON (22)



Die Lactat-Dehydrogenase und NADH₂ dienen dem labor-chemischen Nachweis derjenigen Stellen auf dem Stärkegel, auf denen die GPT durch ihre biochemische Aktivität das Ausgangsprodukt für die LDH, nämlich Pyruvat aus Alanin katalysierte. Bei dem letzten Vorgang wird Pyruvat mittels LDH zu Lactat reduziert, den Wasserstoff dazu bietet NADH₂ an, das dabei selbst zu NAD oxydiert wird. Dieses ist nur im ultravioletten Bereich sichtbar.

Material und Methode

Es wird die Glutamat-Pyruvat-Transaminase mittels horizontaler Stärkegelelektrophorese im Hochspannungsfeld nach SPIELMANN und KÜHNLE (49) untersucht. Als Untersuchungsgut standen rund tausend freiwillige gesunde Blutspender im Alter von 18 bis 55 Jahren beiderlei Geschlechts zur Verfügung, wobei die männlichen Spender naturgemäß mit etwa Dreiviertel überwogen. Es wurden in der Arbeit nur Spender aus dem Raum Niederbayern berücksichtigt.

Das für die Versuche notwendige Material wurde in jeweils gesonderten Pilotröhrchen, enthaltend 1,8 ml ACD-Stabilisator, gespendet. Dieses wurde bis zur Verwendung bei $+4^{\circ}$ bis $+6^{\circ}$ C gelagert. Durch ein - bis zweimaliges Waschen, je nach Transparenz des Überstandes, mit physiologischer Kochsalzlösung und anschließendem Einfrieren für mindestens vier Stunden bei -18° bis -20° C werden die Hämolyseate bereitet.

Als Elektrophoresekammer dient die Kammer zur Trennung der Isoenzymfraktionen der Firma Biotest ⁺⁾ . Die Anoden- und Kathodenseite wird mit je 500 ml Brückenpuffer gefüllt. Der Brückenpuffer ist ein Tris-Citronensäure-Puffer, auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt; das entspricht einer Menge von 6 g Zitronensäure und 12,5 g Trispuffer auf 1.000 ml aqua dest.. Es wurde Electrostarch N^O 171 ⁺⁺⁾ in einer 12prozentigen Aufkochung verwandt.

-
- +) Eine Kammer wurde dankenswerterweise von der Firma Biotest zur Verfügung gestellt.
- ++) Die Stärke Electrostarch N^O 171 wird von der Fa. Electrostarch Co, Madison, Wisconsin/U.S.A. geliefert.

Der Gelpuffer besteht aus 1 : 10 verdünntem Brückenpuffer. Am anodischen und am kathodischen Ende eines Gelblockes wird jeweils eine Lage Elektrophoresepapier WHATMAN 17 in die vorgefertigten Schlitze der Gußbank eingebracht, die den Kontakt zwischen den Elektroden über den Puffer und dem Stärkeblock herstellen.

Nach einstündigem Erkalten bei $+4^{\circ}\text{C}$ ist der Stärkeblock impfbereit. Zu diesem Zweck werden ca. 5 mm x 6 mm große Impfplättchen des oben genannten Elektrophoresepapiers WHATMAN 17 mit Hämolysat getränkt; daraufhin werden die Impfplättchen auf der Kathodenseite in ca. 4 cm Entfernung vom Brückenfilter in die vorbereiteten Schlitze des Gels eingeführt. Auf diese Weise können zehn Proben gleichzeitig untersucht werden. Es ist empfehlenswert, den Rand links und rechts etwas frei zu lassen, weil dort der Eintrocknung wegen andere elektrophoretische Bedingungen herrschen als im Mittelfeld. Die Elektrophoresedauer beträgt 20 Stunden bei 380 V und 40 mA ⁺⁺⁺⁾, unter gleichbleibender Kühlung von $+4^{\circ}$ bis $+6^{\circ}\text{C}$. Der Gelblock ist gegen Austrocknung mit einer Glasplatte abgedeckt.

Nach 20stündiger Laufzeit werden die Stärkeblöcke in üblicher Weise horizontal aufgeschnitten und mit der Schnittfläche nach oben in Glaswannen gelegt. Auf die Schnittflächen wird blasenfrei Filterpapier gelegt, das vorher in Entwicklerlösung getränkt wurde.

+++)) Als Speichergerät dient das Labornetzgerät
Typ CD 600 V der Firma W. Vogel, Gießen

Die Entwicklerlösung für ein bis zwei Kammern besteht aus:

50 ml Brückenpuffer (unverdünnt)

0,89 g L-Alanin

0,064 g α -Ketoglutarensäure

0,036 g NADH·H

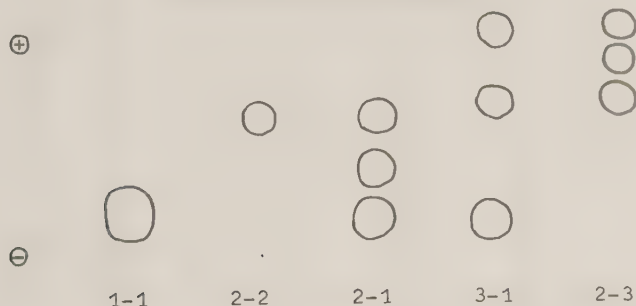
Nach vollständigem Auflösen der Substanzen werden

0,2 ml LDH (10 mg/ 2 ml)

hinzugegeben. Der Chemismus wurde auf Seite beschrieben.

Mit einer UV-Lampe in der Dunkelkammer betrachtet werden die einzelnen Fraktionen als violette Flecken auf farblosem Grund sichtbar. Der Phänotyp GPT 1-1 ist gekennzeichnet durch einen deutlichen runden Punkt, der von der Impfstelle ca. 9 cm entfernt liegt; der Typ GPT 2-2 zeichnet sich durch einen Punkt geringerer Größe und Intensität aus, der ca. 11 cm von der Impfstelle entfernt liegt; der Typ 2-1 ist erkennbar als Mischtyp von GPT 1-1 und GPT 2-2, außerdem ist zwischen den oben genannten Spots noch ein dritter mittlerer Punkt sichtbar in einer Entfernung von rd. 10 cm jenseits der Auftragsstelle. Der innerhalb der Versuchsreihe zweimal gefundene Typ GPT 3-1 ist charakterisiert durch drei Punkte, wobei der erste auf Höhe von 9 cm, der zweite von 10,5 cm und der dritte von 12 cm liegt. Ein fünfter Typ ist gekennzeichnet durch einen insgesamt schnelleren Lauf, wobei der kathodennahe Punkt in Höhe dessen von GPT 2-2 liegt, ihm folgen nahe zwei weitere gleich intensive Punkte. Der schnellste anodennächste Punkt entspricht in der Lage dem dritten von GPT 3-1.

Schematische Abbildung



E i g e n e E r g e b n i s s e

Zweck der Untersuchungen war einerseits das optimale Ausgangsmaterial mit optimaler Lagerungsdauer und Zubereitung sowie eindeutig reproduzierbare Versuchsbedingungen anzugeben. Zum anderen bestand die Aufgabe, die Genhäufigkeit der GPT in Niederbayern zu ermitteln und beifügend genetische Untersuchungen in Form von Mutter/Neugeborenen - und Familienstudien zu betreiben.

a) Alterung der ACD-Blute

Es wurden, wie berichtet, im wesentlichen ACD-Blute verwandt. Es kamen Blutproben verschiedenen Alters zur Untersuchung. Bei dieser speziellen Versuchsreihe scheiden diejenigen Blut aus, die keine oder nur sehr schlechte Spots boten und somit auf eine fehlende oder abgeschwächte Enzymaktivität schließen lassen. Blute, die aus anderen Gründen - z.B. um den Alterungsprozess des Hämolysates beurteilen zu können - mehrmals angesetzt wurden, entfallen bei dieser Bewertung.

Tabelle 1

Alter der Proben (Entnahme-Impfung) in Tagen	Anzahl der Proben	negative Reaktion	Anteil in Prozent
1	35	7	20
2	58	18	31
3	104	27	25
4	68	17	25
5	71	16	23
6	42	6	14
7	136	21	15
8	136	22	16
9	---	---	---
10	83	11	13
11	20	4	20
12	40	14	25
13	---	---	---
14	40	8	20
15	11	2	18
16	70	4	6
17	---	---	---
18	20	1	5
19	19	1	6,5
20	10	2	20
21	14	0	0
23	5	0	0
36	20	0	0
	1.006	181	

Dies ergibt einen mittleren negativen Reaktionsausfall von 18 Prozent.

Stellt man nun den prozentualen Ausfall dem Alter der Blutproben gegenüber, so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 2

Alter der Proben in Tagen	negative Reaktion in Prozent
36	0
23	0
21	0
18	5
16	6
19	6,5
6	14
7	15
8	16
15	18
11	20
1	20
20	20
5	23
4	25
3	25
2	31
12	35

Danach scheint sich ein Untersuchungsoptimum jenseits des 16. Tages zu ergeben, wobei der Abnahmetag nicht mitgerechnet wird. Auffallend ist, daß Ansätze wie wohl nach einem Tag als auch nach elf und nach zwanzig Tagen jeweils zu 20 % kein Resultat liefern. Ob nach eintägiger Lagerung eines ACD-Blutes eine Hämolysierung durch Einfrieren auf -20° C nicht vollständig genug ist, ist einer gesonderten Untersuchung wert und war nicht Gegenstand dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang ist es auch interessant zu bemerken, daß einige Proben erst am dritten oder am vierten Tag nach Einfrieren des Erythrozytensedimentes ein positives Ergebnis brachten.

Beispiele: 419503 am 2. Tag
 S.W. am 3. Tag
 702907 am 4. Tag

Der Wert von 20 % Ausfall nach 11 Tagen entspricht am ehesten dem allgemeinen Ergebnis. Demgegenüber dürfte das Resultat nach 20 Tagen ein schlechtes Zufallsergebnis sein. Ebenso stellt sicher die Untersuchung nach 36 Tagen ein ausgesprochen gutes Zufallsergebnis dar. Ohne noch einer jüngeren Vergleichskontrolle wäre dieser einmalige Befund in der forensischen Medizin mit Vorbehalt zu verwerten. Auch bei noch so steriler Abnahme dürfte sich eine bakterielle Kontamination nicht gänzlich ausschließen lassen. Die Funktionstüchtigkeit der Erythrozyten nimmt nach 30 Tagen bedeutend ab, so daß zu diesem Zeitpunkt mit einer erheblichen Aktivitätsminderung aller Enzyme zu rechnen ist.

b) Negativer Reaktionsausfall in Abhängigkeit vom Geschlecht

Unabhängig von der Alterung des ACD-Blutes werden die Ausfälle nach Geschlecht und Impfstelle untersucht. Zu diesem Zweck werden nur typische Routineläufe, also keine reinen Wiederholungsläufe untersucht, die z.B. Auskunft über den Alterungsprozess des Hämolysates geben sollen. Von 1000 Untersuchungen lieferten 50 Proben männlicher und 13 Proben weiblicher Spender, die am Rand einer Gußplatte geimpft wurden, keine Spots. Insgesamt spendeten von 1000 Personen 193 weibliche Spender Blut. Das ergibt für die weiblichen Spenderblut einen höheren relativen Ausfall von 71 % als für die männlichen Spender (62 %).

Befinden sich die Proben an 2. bis 9. Stelle, so führen 86 männliche und 36 weibliche Blute zu keinem Ergebnis. Hier ist die Signifikanz der "weiblichen Versager-Blute" noch deutlicher, zumal dabei eindeutig veränderte Strombedingungen und Eintrocknung des Stärkeblockes ausgeschaltet werden konnten.

negativer Befund männlicher Spender 10,66 %

negativer Befund weiblicher Spender 19,67 %

c) Allgemeine Schwierigkeiten

Nicht berücksichtigt wurden Läufe, die aus anderen Gründen zu keinem Ergebnis führten. Die Erfahrungen aus den Versuchen ergeben, daß die vorgeschriebene Entwicklertemperatur von 37° C nicht ausreicht. Unter sonst gleichen Bedingungen - gleichzeitiger Ansatz mehrerer Platten, gleicher pH-Wert des Puffers, gleiche Verdünnung der Stärke⁺⁺⁺⁺⁾, gleiche Mengen der Entwicklersubstanzen und gleiche Entwicklerzeit - zeigen diejenigen Platten, die bei ca. 37° C inkubiert wurden, sehr häufig kein Resultat. Als optimal erweist sich eine Brutschranktemperatur von 45° C.

Bei den Enzymen zur Entwicklung der GPT fällt auf, daß mit zunehmender Alterung von Lactat-Dehydrogenase die Spots immer schwächer werden. Wird das Gefäß einen Monat lang täglich geöffnet, so ist nach dieser Zeit kein hinreichendes Ergebnis mit dieser Substanz mehr zu erzielen. Mit den anderen Reagenzien ergeben sich keine Schwierigkeiten.

Eine weitere Fehlermöglichkeit resultiert aus der pH-Einstellung des Puffers, der normalerweise bei 7,5 liegen soll. Ein um 0,1 in den alkalischen Bereich verschobener Puffer wird besser toleriert als ein zu saurerer.

++++) Bezüglich der Stärke ist zu vermerken, daß die neuerdings gelieferte Stärke Electrostarch N^o 271 im Gegensatz zu der früher gelieferten Stärke N^o 171 allgemein ungenügendere Ergebnisse erbrachte; es bildeten sich unter Anwendung von Electrostarch N^o 271 zwischen den Spots Schlieren, eine eindeutige Trennung war häufig schlecht erkennbar.

d) Vergleichende Untersuchungen von ACD - und Nativblut

Wie oben ausgeführt, wurde bei der Untersuchungsreihe ACD-Blut als Ausgangsmaterial verwendet. Die Entnahme bereitete keine Schwierigkeiten, die Sterilität der Proben war gewahrt; außerdem kann man eine größere Menge Hämolyt aus daraus gewinnen. Es ist von Interesse festzustellen, ob als Ausgangsmaterial auch Nativblut dienen kann. Zu diesem Zweck werden Hämolytate aus ACD - und Nativblut parallel angesetzt. Hämolytate aus ACD-Blut werden in üblicher Weise hergestellt, die aus Nativblut durch zwei-bis dreimaliges Waschen möglichst konzentrierter Erythrozytensedimente, die anschließend für mindestens 4 Stunden bei -20° C eingefroren werden.

Es wurden vergleichend 44 Blute untersucht, von 26 Spendern wurden Verkaufskontrollen vom ersten Tag nach Hämolyt-Gewinnung bis ca. zum achten Tag gemacht. In den ersten 3 bis 4 Tagen konnte zwar eine Intensitätsdifferenz sich entsprechender Spots festgestellt werden. Doch ließen sich beide Proben gleich zuverlässig beurteilen. Der Intensitätsunterschied ist wahrscheinlich nicht qualitativ, sondern quantitativ begründet. Die aus Nativblut gewonnenen Hämolytate sind in der Regel von geringerer Konzentration als die aus Zitrat - bzw. ACD-Blut. Ab 5. oder 6. Tag werden in der Regel die Flecken von Nativblut deutlich schwächer oder sind nicht mehr eindeutig zu bestimmen, während die aus ACD-Blut gewonnenen Hämolytate noch nach 6 bis 7 Tagen ein gutes Ergebnis liefern.

Die in Einzelfällen durchgeführten Untersuchungen mit 10 bis 18 Tage alten Hämolytaten brachten die gleich guten Ergebnisse wie frische Hämolytate von 1 bis 3 Tagen - vorausgesetzt, es handelt sich um Hämolytate aus ACD-Blut. Es kann also die Meinung nicht unbedingt geteilt werden, daß die Hämolytate zur GPT-Bestimmung auf keinen Fall älter als 3 Tage sein dürfen. (Das Verhalten der Hämolytate aus Nativblut wurde beschrieben).

c) Allgemeine Schwierigkeiten

Nicht berücksichtigt wurden Läufe, die aus anderen Gründen zu keinem Ergebnis führten. Die Erfahrungen aus den Versuchen ergeben, daß die vorgeschriebene Entwicklertemperatur von 37°C nicht ausreicht. Unter sonst gleichen Bedingungen - gleichzeitiger Ansatz mehrerer Platten, gleicher pH-Wert des Puffers, gleiche Verdünnung der Stärke⁺⁺⁺⁺⁾, gleiche Mengen der Entwicklersubstanzen und gleiche Entwicklerzeit - zeigen diejenigen Platten, die bei ca. 37°C inkubiert wurden, sehr häufig kein Resultat. Als optimal erweist sich eine Brutschranktemperatur von 45°C .

Bei den Enzymen zur Entwicklung der GPT fällt auf, daß mit zunehmender Alterung von Lactat-Dehydrogenase die Spots immer schwächer werden. Wird das Gefäß einen Monat lang täglich geöffnet, so ist nach dieser Zeit kein hinreichendes Ergebnis mit dieser Substanz mehr zu erzielen. Mit den anderen Reagenzien ergeben sich keine Schwierigkeiten.

Eine weitere Fehlermöglichkeit resultiert aus der pH-Einstellung des Puffers, der normalerweise bei 7,5 liegen soll. Ein um 0,1 in den alkalischen Bereich verschobener Puffer wird besser toleriert als ein zu saurerer.

++++) Bezüglich der Stärke ist zu vermerken, daß die neuerdings gelieferte Stärke Electrostarch N^o 271 im Gegensatz zu der früher gelieferten Stärke N^o 171 allgemein ungenügendere Ergebnisse erbrachte; es bildeten sich unter Anwendung von Electrostarch N^o 271 zwischen den Spots Schlieren, eine eindeutige Trennung war häufig schlecht erkennbar.

$$GPT^2 = \frac{2 \times GPT\ 2-2 + GPT\ 2-1 + GPT\ 2-3}{2 \times \text{Gesamtmenge}} = \frac{2 \times 211 + 507 + 1}{2 \times 1000}$$

$$= 0,4650$$

$$GPT^3 = \frac{2 \times GPT\ 3-3 + GPT\ 1-3 + GPT\ 2-3}{2 \times \text{Gesamtmenge}} = \frac{2 + 1}{2 \times 1000}$$

$$= 0,0015$$

Durch Multiplikation des Quotienten der Genfrequenzen mit der Gesamtzahl der untersuchten Mäuse gelangt man zu den erwarteten Absolutzahlen für H o m o z y g o t e; durch Multiplikation der entsprechenden Genfrequenzen mit der doppelten Gesamtzahl zu den H e t e r o z y g o t e n . Für GPT 1-1 lautet die Formel somit:

$$GPT^1 \times GPT^1 \times \text{Gesamtzahl},$$

für GPT 2-2 analog

$$GPT^2 \times GPT^2 \times \text{Gesamtzahl},$$

(entsprechend GPT 3-3) .

Für die Berechnung von GPT 2-1 folglich

$$GPT^1 \times GPT^2 \times 2 \times \text{Gesamtzahl},$$

für GPT 3-1 somit

$$GPT^1 \times GPT^3 \times 2 \times \text{Gesamtzahl}$$

und für GPT 2-3 letztlich

$$GPT^2 \times GPT^3 \times 2 \times \text{Gesamtzahl}.$$

Tabelle 8

Phänotyp	Beobachtet		Erwartet		χ^2
	n	%	n	%	
1-1	279	27,9	284,62225	28,4622	I
2-1	507	50,7	496,15500	49,6155	
2-2	211	21,1	216,22500	21,6225	
1-3	2	0,02	1,60050	0,1600	II
2-3	1	0,01	1,39500	0,1395	
3-3	0	0,00	0,00225	0,0002	
Gesamt	1.000	100	1000,00000	99,9999	0,6881842

$$GPT^1 = 0,5335$$

$$GPT^2 = 0,4650$$

$$GPT^3 = 0,0015$$

P-Wert (gesamt)

70 - 80 %

P-Wert I

50 %

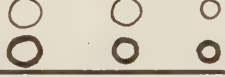
P-Wert II

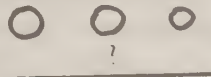
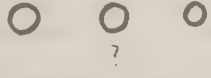
90 %

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
703379 Hämolyse:ACD Nativ naß Spur:								
703380 Hämolyse:ACD Nativ naß Spur:								
703381 Hämolyse:ACD Nativ naß Spur:								
703382 Hämolyse:ACD Nativ naß Spur:								
703385 Hämolyse:ACD Nativ naß Spur:								
703386 Hämolyse:ACD Nativ naß Spur:								

Die Tabelle stellt die schematischen Bilder der GPT-Spots dar. Die linke Seite jeder Spalte zeigt die Kathodenseite an, die rechte Seite jeweils die Anodenseite an verschiedenen Tagen. Der Intensitätsunterschied wird durch die Größe der Punkte und Stärke der Linienführung deutlich gemacht. Ein einzelner kathodennaher Punkt zeigt GPT 1-1 an, drei Punkte charakterisieren den GPT 2-1-Typ, ein anodenwärts gelegener Punkt weist auf GPT 2-2 hin. Am intensivsten ist die Enzymaktivität inner bei ACD-Hämolyse nachweisbar, so daß ACD-Blut für die GPT-Bestimmung als das Ausgangsmittel der Wahl angesehen werden kann.

Tabelle 4

456793	Hämolysat: ACD Nativ	
456794	Hämolysat: ACD Nativ	
456796	Hämolysat: ACD Nativ	
456797	Hämolysat: ACD Nativ	
456798	Hämolysat: ACD Nativ	
456805	Hämolysat: ACD Nativ	
456809	Hämolysat: ACD Nativ	
456810	Hämolysat: ACD Nativ	
456811	Hämolysat: ACD Nativ	
456812	Hämolysat: ACD Nativ	
456813	Hämolysat: ACD Nativ	
456815	Hämolysat: ACD Nativ	
456816	Hämolysat: ACD Nativ	

456817	Hämolysat: ACD Nativ	
456818	Hämolysat: ACD Nativ	
456819	Hämolysat: ACD Nativ	
456820	Hämolysat: ACD Nativ	
456821	Hämolysat: ACD Nativ	

Es sind die GPT-Banden schematisch dargestellt. Die linke Seite der Spalte bedeutet die Auftragsstelle auf der Kathodenseite, der rechte Rand die Anodenseite. Die GPT-Typen sind durch ihre Banden wie folgt charakterisiert:

GPT 1-1: ein kathodennaher Punkt,

GPT 2-2: ein anodenwärtsgelegener Spot,

GPT 2-1: drei hintereinanderliegende von Kathode zur Anode laufende Punkte.

Während durch die Tabelle 3 unterschiedlich alte Hämolysate aus verschiedenem Ausgangsmaterial dargestellt werden, zeigt die Tabelle 4 einen Tag alte Hämolysate verschiedener Zubereitung. Es zeigt sich regelmässig deutlich ein Intensitätsunterschied von ACD- und Nativblut zu Gunsten der aus ACD-Blut hergestellten Hämolysate, so daß für die GPT-Bestimmung ACD-Blut am geeignetsten erscheint.

f) Untersuchung an Neugeborenen - Blutproben und deren Müttern

Ein weiterer Gegenstand der Arbeit war, das Verhalten der Erythrozyten-GPT von Mutter und Neugeborenen zu untersuchen +++++). Hierzu werden der Mutter post partum Venenblut und dem Neugeborenen Nabelschnurvenenblut entnommen. Die Mutter/Kind-Proben werden nebeneinander angesetzt, um sie vergleichend beobachten zu können.

Tabelle 5

Name	Mutter	Kind
1. Ja.	1-1	2-1
2. Ri.	2-1	1-1
3. Sö.	1-1	1-1
4. Be.	1-1	2-1
5. Wi.	1-1	2-1
6. He.	2-2	2-1
7. Hu.	2-1	2-1
8. Da.	2-2	2-1
9. Br.	2-1	2-2
10. Rü.	1-1	1-1
11. Me.	1-1	2-1
12. Lu.	1-1	1-1
13. Ba.	1-1	2-1
14. Bö.	1-1	1-1
15. Bo.	1-1	1-1
16. Ke.	2-1	2-1
17. St.	2-1	2-1
18. Do.	2-1	1-1
19. El.	2-2	2-2
20. Mo.	2-2	2-2

Allgemein kann festgestellt werden, daß Blute Neugeborener sehr gute, kräftige und eindeutig beurteilbare Enzymbanden bieten. Die Mütter jedoch liefern in der Regel schwächere Spots. Diese Beobachtung paßt in die eingangs erwähnte, daß nämlich Blute weiblicher Spender schlechtere Ergebnisse bieten als Blute männlicher Probanden. Eine unterschiedliche Alterung der Mutter/Kind-Blute scheidet von vornherein aus. Das Hämolysat wird möglichst gleich konzentriert zubereitet.

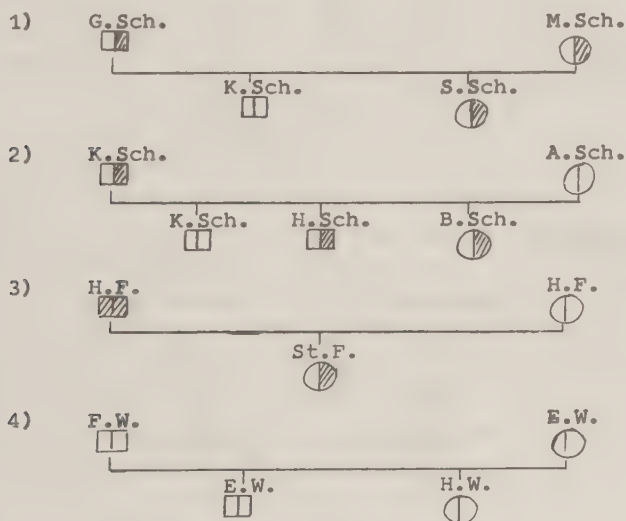
+++++) An dieser Stelle sei Herrn Dr. med. Georg
OPITZ, Chefarzt der Klinik Dr. Opitz, Regens-
burg, Luitpoldstrasse 11 b, bedankt.

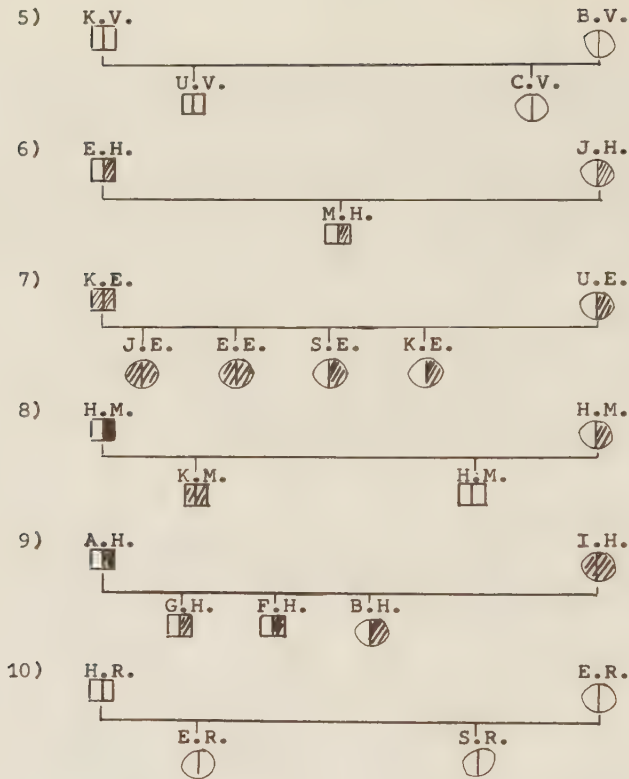
Die Tabelle zeigt, daß 10 Mutter-Kind-Paare verschiedene GPT-Phänotypen besitzen, 10 Paare verfügen über die gleichen Enzym-Muster. Somit ist es trotz des kleinen Kollektives berechtigt anzunehmen, daß Neugeborene bereits eigene lebensfähige Erythrozyten und mithin ein eigenes Enzympanel - mindestens hinsichtlich der GPT - entwickelt haben. Es kann sich nicht ausschließlich um Leiherythrozyten handeln.

Eine inkompatible Homozygotie wurde in keinem Fall festgestellt. Ob tatsächlich in diesem Enzymsystem ein stummes Gen ausgeschlossen ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Ein Hinweis für GPT⁰ ergab sich bei diesen und den folgenden Familienuntersuchungen nicht.

g) Familienstudien

Zur Beleuchtung des Erbganges wurden zehn Familien auf das Verhalten der GPT untersucht.





Zeichenerklärung:

männlich

weiblich



1-1



2-1



2-2



Tabelle 6

Phänotypen-Kombinationen	Anzahl der Familien	Kinder			
		1-1	2-1	2-2	Gesamt
1-1 x 1-1	3	6	-	-	6
1-1 x 2-1	1	1	2	-	3
1-1 x 2-2	1	-	1	-	1
2-1 x 2-1	3	2	2	1	5
2-1 x 2-2	2	-	5	2	7
Gesamt	10	9	10	3	22

In diesem Familienkollektiv kommen alle Kombinationen der häufigen Phänotypen vor, bis auf 2-2 x 2-2. Dreimal sind reinerbige Familien des Phänotypus 1-1 beschrieben. Eine entgegengesetzte Homozygotie konnte auch hier nicht gefunden werden. Die Kinder besitzen kein Merkmal, daß ihren Eltern fehlt. Aus der Elternpaarung 1-1 x 2-1 entsteht kein reinerbiges 2-2 - Kind, ebenso aus der Verbindung 2-1 x 2-2 kein homozygotes 1-1 - Kind. Nun ist die Zahl der Nachkommen zwar gering. Dennoch liegt die Vermutung nahe, daß ein stummes Gen hier wahrscheinlich nicht vorkommt. Auch der Verdacht auf Illegitimität eines Kindes konnte abgewiesen werden. Es zeigt sich ein kodominanter Erbgang. Eine geschlechtsgebundene Vererbung ergab sich in diesem System nicht. Eine ausschließliche Bevorzugung eines Types von einem Geschlecht konnte jedenfalls nicht bestätigt werden.

n) Statistik

Es wurden Blute freiwilliger Spender aus dem Raume Niederbayern hinsichtlich der GPT in den Erythrozyten nach der Methode von SPIELMANN und KÜHNEL (49) mittels horizontaler Stärkegelelektrophorese untersucht. Von ca. 1.200 untersuchten Bluten wurden 1.000 Proben mit einem eindeutigen Ergebnis ausgewählt. Die folgende Tabelle zeigt den Anteil männlicher und weiblicher Spender bezüglich der einzelnen GPT-Genotypen auf.

Tabelle 7

Genotyp	Gesamt	männlich		weiblich	
		absolut	Prozent	absolut	Prozent
2-1	507	407	80,28	100	19,72
1-1	279	215	77,06	64	22,94
2-2	211	183	86,73	28	13,27
3-1	2	1	50,00	1	50,00
2-3	1	1	100,00	-	0,00
3-3	---	---	-----	---	-----
Gesamt	1.000	807	80,70	193	19,30

Zur Errechnung der Genfrequenz wird die zweifache relative Häufigkeit der Reinerbigen und die einfache relative Häufigkeit der Gemischterbigen addiert und diese Summe durch die doppelte Gesamt-(= Bezugs)menge dividiert. (43,39).

$$GPT^1 = \frac{2 \times GPT\ 1-1 + GPT\ 2-1 + GPT\ 3-1}{2 \times \text{Gesamtmenge}} = \frac{2 \times 279 + 507 + 2}{2 \times 1000}$$

$$= 0,5335$$

$$GPT^2 = \frac{2 \times GPT\ 2-2 + GPT\ 2-1 + GPT\ 2-3}{2 \times \text{Gesamtmenge}} = \frac{2 \times 211 + 507 + 1}{2 \times 1000}$$

$$= 0,4650$$

$$GPT^3 = \frac{2 \times GPT\ 3-3 + GPT\ 1-3 + GPT\ 2-3}{2 \times \text{Gesamtmenge}} = \frac{2 + 1}{2 \times 1000}$$

$$= 0,0015$$

Durch Multiplikation des Quadrates der Genfrequenzen mit der Gesamtzahl der untersuchten Blüte gelangt man zu den erwarteten Absolutzahlen für H o m o z y g o t e; durch Multiplikation der entsprechenden Genfrequenzen mit der doppelten Gesamtzahl zu den H e t e r o z y g o t e n . Für GPT 1-1 lautet die Formel somit:

$$GPT^1 \times GPT^1 \times \text{Gesamtzahl},$$

für GPT 2-2 analog

$$GPT^2 \times GPT^2 \times \text{Gesamtzahl},$$

(entsprechend GPT 3-3) .

Für die Berechnung von GPT 2-1 folglich

$$GPT^1 \times GPT^2 \times 2 \times \text{Gesamtzahl},$$

für GPT 3-1 somit

$$GPT^1 \times GPT^3 \times 2 \times \text{Gesamtzahl}$$

und für GPT 2-3 letztlich

$$GPT^2 \times GPT^3 \times 2 \times \text{Gesamtzahl}.$$

Tabelle 8

Phänotyp	Beobachtet		Erwartet		χ^2
	n	%	n	%	
1-1	279	27,9	284,62225	28,4622	0,1110584
2-1	507	50,7	496,15500	49,6155	0,2370509
2-2	211	21,1	216,22500	21,6225	0,1262602
1-3	2	0,02	1,60050	0,1600	0,0997189
2-3	1	0,01	1,39500	0,1395	0,1118458
3-3	0	0,00	0,00225	0,0002	0,0022500
Gesamt	1.000	100	1000,00000	99,9999	0,6881842

$$GPT^1 = 0,5335$$

$$GPT^2 = 0,4650$$

$$GPT^3 = 0,0015$$

P-Wert (gesamt)

70 - 80 %

P-Wert I

50 %

P-Wert II

90 %

Aus der Tabelle 8 ist ersichtlich, daß sich Beobachtungs- und Erwartungswerte nahezu entsprechen. Ausdruck des Verhältnisses dieser Zahlengruppen ist der Begriff χ^2 . Er zeigt, inwieweit die Abweichung im Bereich des Zufalls liegt; je kleiner der Wert, um so besser demzufolge das Ergebnis. Er berechnet sich wie folgt:

$$\chi^2 = \frac{(\text{Beobachtungswert} - \text{Erwartungswert})^2}{\text{Erwartungswert}}$$

Die Summe aller χ^2 beträgt bei der durchgeführten Versuchsreihe 0,6881842. Die χ^2 -Summe der häufigen Typen beläuft sich auf 0,4743695, die der seltenen Typen auf 0,2138047. Mit Hilfe der Summe aller χ^2 läßt sich nach den Tabellen von FISHER (14) und PÄTAU (37) auf den P-Wert schließen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der Abweichungen von Stichproben einer bestimmten Menge von Untersuchungen zufällig größer sich ergeben können als die gegebene Abweichung, wird als Wert P (probability) bezeichnet. Zu berücksichtigen beim Feststellen des Wertes P sind die Freiheitsgrade. Der Freiheitsgrad errechnet sich aus der Summe der Genzahl minus 1. Im betreffenden Fall liegen somit zwei Freiheitsgrade vor. Der P-Wert aus der Summe aller χ^2 beträgt 70 - 80 %, aus der Summe der häufigen χ^2 50 %, und aus der Summe der seltenen χ^2 beläuft er sich auf 90 %.

i) Anwendung des GPT - Systems in der Vaterschaftsbeurteilung

Wie eingangs erwähnt, gibt es viele Blutgruppen-, Serum- und Isoenzymssysteme, die einen Polymorphismus aufweisen. Kommt aber eine Gruppeneigenschaft nahezu bei 100 % aller Individuen vor, so hat diese Eigenschaft in forensischer Sicht wenig Bedeutung. Erst eine breitgestreute Verteilung der die Vielförmigkeit auslösenden Gene macht ein System für gerichtsmedizinische Zwecke bedeutsam. Der Vererbungsmodus läßt sich durch Familienstudien bestimmen. So ist es möglich, mit Hilfe

serologischer Untersuchungen einen vermeintlichen Vater als Zeuger des betreffenden Kindes (bei bekannter Mutter/Kind-Konstellation) auszuschließen oder nicht. Ein Kind kann nur die Eigenschaften von Mutter und Vater geerbt haben. Hat das Kind einen Typ, den weder Mutter noch vermeintlicher Vater haben, so kann man diesen Mann als den Zeuger des Kindes ausschließen, wenn auch das erbbiologische Gutachten und das der Tragzeit den Ausschluß bestätigen. Ein hundertprozentiger Beweis für oder gegen die Vaterschaft ist aus der Sicht des Serologen nicht möglich, da sich die Genmuster auch bei anderen Individuen wiederholen. Wohl aber trägt die Vielzahl aufschlußreicher Systeme zur Sicherung einer positiven oder negativen Aussage bei. Aufschlußreich ist ein System, das von mehreren, etwa gleich verteilten Genen (möglichst drei und mehr) kodominant gesteuert wird. Aus diesem Grunde ist das GPT-Isoenzymsystem für forensische Zwecke besonders geeignet. Zwei Gene nehmen jeweils etwa die Hälfte ein. Das dritte Gen zeichnet sich durch geringe Frequenz aus, so daß bei Vorhandensein dieses Genes bei Vater und Kind der Verdacht einer wahren Vaterschaft sehr nahe liegt, besonders, wenn die Mutter dieses Gen (GPT^3) nicht besitzt.

Mit Hilfe der Genfrequenzen läßt sich die Vaterschaftsausschlußwahrscheinlichkeit (VACH) nach SPEISER und PAUSCH (47) und MAYR (33) berechnen:

$$VACH = ab(1-ab) + ac(1-ac) + bc(1-bc) + abc(1 - /ab+bc+ac/),$$
wobei a , b und c den jeweiligen Genfrequenzen entsprechen.

Es konnte ein Wert von 0,18888691 ermittelt werden, das entspricht einer VACH von 18,89 %. Dieser Wert deckt sich nahezu mit dem von RITTER (40) mit 18,67 % angegebenen. Mit den bisherigen Systemen bei Vaterschaftsgutachten ergibt sich eine kombinierte Ausschlußchance von 92,05 %.

Für die Richtigkeit des Wertes von 18,89 % und die der vor-
ausgegangenen Ergebnisse spricht, daß alle Zahlenkolonnen mehr-
mals mit einem Elektronenrechner durchgerechnet wurden und immer
wieder zu gleichen Ergebnissen führten. +++++)

++++++) Es sei hier Herrn stud. rer. nat. Eberhard Anke,
Regensburg, Nürnberger Str., für die Rechenhilfe ge-
dankt.

D i s k u s s i o n

Der von CHEN et al. (6) gefundene Enzym polymorphismus der GPT konnte von anderen Autoren und durch diese Arbeit bestätigt werden. Während CHEN die vertikale Stärke-Elektrophorese durchführt, wird im deutschsprachigen Raum die horizontale Elektrophorese bevorzugt. Die beschriebene horizontale Elektrophorese ist ohne erhebliche Schwierigkeiten zu handhaben, das Ablesen bringt im Allgemeinen eindeutige Resultate. Es kann jedoch sein, daß der GPT-1-1-Typ außer dem langsamen markanten Punkt noch einen geringfügig schnelleren, aber weniger großen Punkt bietet. Dann ist abzuwägen, ob es sich um einen 1-1-Typ oder um einen 2-1-Typ handelt. Diese Blute wurden mehrmals angesetzt und so dann doch ein meist eindeutiges Resultat erzielt.

Vergleicht man die eigenen Ergebnisse mit denen anderer Autoren, so ergibt sich eine hinreichend gute Übereinstimmung. Unser Kollektiv ist von den tabellarisch aufgeführten das größte.

Tabelle 9

Phänotyp	CHEN et al. 1971 (6)			KÖMPF (23) 1971	BENDER (3) 1972	CHEN (7) 1972 Seattle	GUSMANN (18) 1972	eigene Unter- suchung
	Caucasian	Oriental- Amerikan	Afro- Amerikan					
1-1	59	71	146	86	71	145	221	279
2-1	133	115	66	154	125	216	400	507
2-2	61	29	8	64	59	117	210	211
3-1	-	-	-	-	-	2	2	2
2-3	-	-	-	-	-	3	4	1
3-3	-	-	-	-	-	-	-	-
Gesamt	253	215	220	304	225	528	837	1000
Frequenz								
GPT ¹	0,496	0,598	0,814	0,54	0,52	0,523	0,5041	0,5335
GPT ²	0,504	0,402	0,186	0,46	0,48	0,472	0,4922	0,4650
GPT ³	-	-	-	-	-	0,005	0,0035	0,0015

Auffallend ist, daß bis Mitte 1972 nur drei GPT-Typen gefunden wurden. Erst dann stieß man auf schnellere Typen, die in das gewohnte Bild nicht hineinpaßten. Man schloß auf ein drittes Gen, das jedoch insgesamt eine sehr geringe Frequenz hat, wie aus der Tabelle ersichtlich wird. In der aufgezeigten Versuchsreihe wurden drei Sondertypen gefunden: 2mal der GPT 1-3-Typ, 1mal der GPT 2-3-Typ. Die Beurteilung der Sondertypen erfolgte zurückhaltend. Nur eindeutige Befunde nach sehr häufigem Ansetzen verschiedener Proben des gleichen Spenders hatten Gültigkeit. So konnte nur eine sehr geringe Frequenz von GPT³ von 0,0015 ermittelt werden.

Im übrigen mag die Frequenzverteilung auch an der Bevölkerungsstruktur Niederbayerns liegen, das vorwiegend ländliche Bevölkerung und (daraus folgernd) geringe Fluktuation aufweist.

Wie bei der sauren Erythrozyten-Phosphatase spielt auch hier das Alter der Blutproben eine ausschlaggebende Rolle. Da die Untersuchungen an einer Blutbank betrieben wurden, war eine Aussage über den Alterungsprozeß gut möglich. Es konnten jeweils gleich alte Blute angesetzt werden. Unterschiedliche Lagerung und Wegezeit - wie sie in der serologischen Gutachterpraxis üblich sind - fallen fort. Bis zur Gewinnung von Hämolysaten wurden die Blute einheitlich bei +4°C bis +6°C gelagert. Dabei zeigte sich, daß frische ACD-Blute schlechtere Ergebnisse lieferten, als ca. 16 Tage alte. Die Hämolysate waren jeweils 1 Tag alt bis zur Impfung. Indikator für diese Aussage war das Fehlen oder das nicht zu beurteilende Bild der Banden. In der entsprechenden Literatur sind diesbezüglich keine Hinweise zu finden. Somit ist es also wichtig, für forensische Zwecke die Proben mehrmals anzusetzen.

Hierbei sei auch noch auf das Verhalten weiblicher Spenderblute hingewiesen. Es zeigte sich, daß die "Versagerquote" bei Proben weiblicher Spender bezüglich des Verhaltens der GPT fast um das Doppelte so groß ist wie das der männlichen. Es ist aber eine Differenzierung in männliche und weibliche Personen

allein aus dem Bild der Banden nicht möglich. Das Ergebnis wurde retrospektiv erarbeitet. Während des Ablesens war das Geschlecht noch unbekannt. Erst durch die vergleichenden Auswertungen kam dieses überraschende Ergebnis zu Tage. Von anderen Autoren ist nichts ähnliches berichtet worden.

Von praktischer Bedeutung schien auch, den optimalen Zeitpunkt und das optimale Ausgangsmaterial für die GPT-Bestimmung zu ermitteln. Es wurden Hämolysate verschiedener Herstellung und unterschiedlichen Alters geimpft. Dabei zeigte sich, daß Hämolysate aus ACD-Blut am besten geeignet sind. Vermutlich sind nach einmaligem Waschen der Sedimente noch ausreichend große Mengen ACD-Stabilisator zurückgeblieben, die die Haltbarkeit und Enzymaktivität auch des Hämolysates günstig beeinflussen. Bezüglich der Alterung von Hämolysaten wurde festgestellt, daß das Ergebnis bei 5 bis 6 Tage alten Hämolysaten häufig schon unzureichend ist. Auch nach den Erfahrungen anderer Untersucher (SPIELMANN, eigene Mitteilung) ist einer Bestimmung der GPT von möglichst frischen (= 1 bis 3 Tage alten) Hämolysaten der Vorzug zu geben.

Bei der Untersuchung von sehr geringen Blutmengen (Blutspuren) war aufgefallen, daß die Befunde in der Regel den Hämolysaten aus ACD-Blut in Qualität und Eindeutigkeit nachstehen. Es ist fast unmöglich, nur allein aus einer Blutspur heraus ein hinreichend sicheres Urteil über den GPT-Phänotyp zu fällen. Zwar scheint sich die Enzymaktivität in durchtränkten Spuren besser zu entfalten als bei in trockenem Zustand geimpften Spuren, dennoch ist das Ergebnis nicht signifikant genug. Ähnliche Untersuchungen hinsichtlich der GPT wurden noch nicht beschrieben.

Bezüglich der Genetik der löslichen GPT untersuchten wir Nabelschnurblut Neugeborener und Venenblut ihrer Mütter. Bei zwanzig Mutter-Kind-Paaren fand sich keine kritische Kombination. Ob ein stummes Gen in diesem System vorkommt und in welcher Frequenz, kann von so einem kleinen Kollektiv nicht beurteilt werden. Es ergab sich kein Hinweis. In zehn von zwanzig Fällen bestand keine Übereinstimmung des mütterlichen

und des kindlichen Genotyps. Zehn Mutter-Kind-Paare wiesen den gleichen GPT-Phänotypus auf. Man kann daraus schließen, daß kindliche Erythrozyten darnach über einen eigenen funktions-tüchtigen Enzymapparat - zumindest im GPT-System - verfügen. Die Qualität der kindlichen Blutbefunde ist sehr gut, die Spots sind gut zu lokalisieren. Sie sind sogar zumeist wesentlich kräftiger als bei ihren Müttern.

HEIDE (18a) hat bei der G-6-PD ähnliches beobachtet, nicht jedoch bei der 6-PGD. Mit Hilfe von Dosisuntersuchungen konnte dieses Ergebnis verifiziert werden. Auch LÖHR und WALLER (32a) sowie BARTELS (2a) fanden eine größere Isoenzym-aktivität bei Neugeborenen als bei Erwachsenen. Man schloß auf eine vermehrte Retikulozytenzahl als Ursache, die in Neugeborenenblut 2 - 5 % beträgt. Wohl aber spielen hormonelle, noch nicht näher bekannte Faktoren eine wesentliche Rolle bei diesem Phänomen. Es ist zu vermuten, daß das allgemein schwächere Bandenbild weiblicher Spenderblute auch hormonellen Regulations-mechanismen unterliegt.

Während Versuchsreihen über die GPT bei Neugeborenen noch nicht beschrieben wurden, ist das Familienmaterial in der Literatur recht groß. CHEN untersuchte als Erster Familien bezüglich des GPT-Verhaltens; die Zahl ist nicht bekannt. KÖMPF (1971) beschrieb 92 Familien mit 193 Kindern, CHEN (1972) untersuchte 130 Familien mit 407 Kindern, In der vorliegenden Arbeit wurden zehn Familien mit 22 Kindern zusammengestellt. Dabei zeigt sich immer wieder ein kodominanter Erbgang, es handelt sich also um zwei Allele auf einem autosomalen Genlocus. Das dritte Allel konnte bei den Familienstudien nicht gefunden werden.

Die Verteilung der Allele GPT^1 und GPT^2 liegt bei ca. 50 %, sodaß sich für forensische Zwecke sehr günstige Voraussetzungen ergeben. Die Vaterschaftsausschlußwahrscheinlichkeit (VACH) für GPT liegt in Höhe der VACH für das MN/Ss-System, nämlich bei 18,89 %. Somit wird eine Aufnahme dieses Systems in die Richtlinien für die Erstattung von Blutgruppengutachten mit großem Interesse diskutiert.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Nachdem vor 2 Jahren (1971) CHEN (6) einen neuen Enzym-polymorphismus in den Erythrozyten, nämlich den der Glutamat-Pyruvat-Transaminase fand, richtete sich das Interesse auch deutscher Serologen auf dieses Enzym, zumal die günstige Verteilung zweier Allele mit annähernd jeweils 50 % und eines sehr seltenen Alleles mit 0,1 % bis 0,3 % Fortschritte in der Vaterschaftsbegutachtung versprechen.

Die Methode der horizontalen Stärkegelelektrophorese konnte für die GPT-Auftrennung standartisiert werden. In der Regel wurden die Hämolysate aus Bluten mit ACD-Stabilisator (entsprechend den Pilot-Röhrchen) gewonnen. Es zeigte sich, daß die Pilotröhrchen etwa 16 Tage lang bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert werden können. Weibliche Spenderblute liefern häufig schlechtere Ergebnisse als männliche. Die Hämolysate sind möglichst in den ersten 3 bis 4 Tagen zu verimpfen. Die GPT-Bestimmung von Blutspuren ist unzureichend. Anhand von Familienuntersuchungen und Mutter-Neugeborenen-Untersuchungen ergab sich Kodominanz aller drei Allele. Eine geschlechtsgebundene Vererbung liegt nicht vor. Neugeborene verfügen offenbar über eigene funktions-tüchtige Erythrozyten bezüglich des Enzyms Glutamat-Pyruvat-Transaminase. Ein größeres Kollektiv könnte diese Theorie bestätigen.

Die Verteilung der Phänotypen in der niederbayerischen Bevölkerung liegt in entsprechenden Größenordnungen anderer Autoren. Auch die gefundenen Genfrequenzen zeigen Korrelanz.

Herrn Prof. Dr. med J. Jungwirth möchte ich für die Überlassung des Themas und seine freundliche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit herzlich danken.

Bei dem Blutspendedienst des BRK und seinen Regensburger Mitarbeitern möchte ich mich für die Beschaffung des Untersuchungsgutes und für die Bereitstellung des Arbeitsraumes mit den dazugehörenden Laborgeräten bedanken. Ohne diese Unterstützung wäre mir die Erstellung der vorliegenden Arbeit unmöglich gewesen.

Insbesondere bedanke ich mich bei Frau Oberarzt Dr. med. Anneliese Bär, der Leiterin des Institutes Regensburg des Blutspendedienstes, die mir stets mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand.

L e b e n s l a u f

Am 21.12.1942 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. med. Georg Schade und seiner Ehefrau Maria, geb. Braun, in Braunsberg/Ostpreußen geboren. Erstes Kind meiner Eltern ist mein um 2 Jahre älterer Bruder, der ebenfalls Arzt ist.

Nach der Vertreibung aus Ostpreußen siedelten wir uns 1945 in Neustadt-Glewe/Mecklenburg an, wo ich die achtjährige dortige Grundschule besuchte. Anschließend absolvierte ich die vierjährige Oberschule in der benachbarten Kreisstadt Ludwigslust, wo ich 1961 das Reifezeugnis erwarb.

Fünf Tage vor dem Bau der Berliner Mauer gelang uns die Flucht in die Bundesrepublik Deutschland. Gemäß einer damaligen Verordnung mußte ich in einem einjährigen Ergänzungslehrgang die Hochschulreife für eine Universität in der Bundesrepublik erwerben.

Darauf begann ich 1962 das Studium der Medizin an der Universität Bonn für sechs Semester. Nach einem Semester an der Wiener Universität beendete ich das Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, an der ich 1968 das Staatsexamen der Medizin ablegte.

Nach Ableistung einer einjährigen Medizinalassistentenzeit arbeitete ich ein Jahr auf der Medizinischen Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder, Regensburg unter Prof. Dr. med. Paul Doering.

Im Jahre 1968 heiratete ich den Journalisten Eberhard Woll. Wir haben zwei Kinder. Der kleinen Kinder wegen bin ich nun seit eineinhalb Jahren halbtags als Ärztin beim Blutspendedienst des BRK, Institut Regensburg, tätig.

Im Sommer 1972 wurde mir von Prof. Dr. med. Jungwirth das Thema der vorliegenden Arbeit übergeben.

Hignid Woll

L i t e r a t u r

- 1) ALLEN, F.H., L.K. DIAMOND und B.NIEDZIELA, 1951: A new blood group antigen. Nature (Lond.) 167, 482
- 2) AZEN, E.A., und O.SMITHIES, 1968: Genetic polymorphism of C'3 (β_{1c} -globulin) in human serum. Science 162, 905
- 2a) BARTELS, H., 1967: Die Enzyme des Energiestoffwechsels in Erythrozyten junger Säuglinge im Vergleich zum Erwachsenen. Z. Kinderheilk. 101, 338
- 3) BENDER, K., R.WIESE und H.ROPERS, 1972: GPT-Polymorphismus: Darstellung auf Celluloseacetatfolie und Allelhäufigkeiten, Vortrag auf der 4. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde in Trier
- 4) BERNSTEIN, F., 1925: Zusammenfassende Betrachtung über erbliche Blutstrukturen des Menschen. Zschr. indukt. Abstamm.-Vererb. lehre 37, 237
- 5) BOWMAN, J.M., H.FRISCHER, F.AJMAR, P.E.CARSON und M.K.GOWER, 1967a: Population, family and biochemical investigation of human adenylate kinase polymorphism. Nature (Lond,) 214, 1156
- 6) CHEN, S-H., E.R.GIBLETT, 1971: Polymorphism of soluble glutamatic-pyruvic transaminase: A new genetic marker in man. Science 173, 148-149
- 7) CHEN, S-H., R.GIBLETT, J.E.ANDERSON and B.L.G.FOSSUM, 1972: Genetics of glutamatic-pyruvic transaminase: its inheritance, common and rare variants, population distribution, and differences in catalytic activity. Hum. Genet.London 35, 401-409
- 8) CALLENDER, SHEILA, T., und R.R.RACE, 1946: A serological and genetical study of multiple antibodies formed in response to blood transfusion by a patient with lupus erythematosus diffusus. Ann. Eugen. 13, 102
- 9) COOMBS, R.R.A., A.E.MOURANT und R.R.RACE, 1946: In-vivo isosensitization of red cells in babies with haemolytic disease. Lancet I, 264

- 10) CUTBUSH, M., P. L. MOLLISON und D. M. PARKIN, 1950: A new human blood group. *Nature* 165, 188
- 11) FAGERHOL, M. K., und M. BRAEND, 1965: Serum prealbumin: Polymorphism in man. *Science* 149, 3687, 986
- 12) FILDES, R. A., und H. HARRIS, 1966: Genetically determined variation of adenylate kinase in man. *Nature* 5020, 209, 261
- 13) FILDES, R. A., und C. W. PARR, 1963: Human red cell phosphogluconate dehydrogenase. *Nature* 200, 890
- 14) FISHER und YATES: "Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research" (in Race and Sanger: Blood groups in man)
- 15) GRUBB, R., 1948: Correlation between Lewis blood group and secretor character in man. *Nature (Lond.)* 162, 933
- 16) GRUBB, R., und LAURELL, A. B., 1956: Hereditary serological human serum groups. *Acta path. microbiol. Scand.* 39, 390
- 17) GUSSMANN, ST., und K. RAMES, 1972: Die Darstellung der Polymorphismen Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT, E.C.: 2.6.1.2) und der Phosphoglucomutase (PGM₁, E.C.: 2.7.5.1) mittels horizontaler Stärkegelelektrophorese in einem Arbeitsgang. *Z. Rechtsmedizin* 70, 148 - 149
- 18) GUSSMANN, ST., and SCHWARZFISCHER, F., 1972: Rare GPT-Phenotyps in a Random Sample of Southern Germany: Evidence for a Third Allel. *Z. Rechtsmedizin* 70, 251 - 252
- 18a) HEIDE, K.-G., und N. PETERSEN, 1971: Vergleichende Aktivitätsuntersuchungen von 6-PGD und G-6-PD bei Neugeborenen und deren Müttern. 3. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde e.V., Mainz, 11. - 13. Okt. 1971
- 19) HIRSCHFELD, J., 1959: Immuno-electrophoretic demonstration of qualitative differences in human sera and their relation to the haptoglobins. *Acta path. microbiol. Scand.* 47, 2, 160
- 20) HOPKINSON, D. A., und SPENCER, M., und H. HARRIS, 1964: Phosphoglucomutase polymorphism in man. *Nature* 4960, 240, 742
- 21) HOPKINSON, D. A., N. SPENCER and H. HARRIS, 1963: Red cell acid phosphatase variants: A new human polymorphism. *Nature* 199, 969

- 22) KARLSON, P., 1962: Kurzes Lehrbuch der Biochemie 130, 240
Edition Stuttgart
- 23) KÖMPF, J., 1971: Soluble Glutamic-Pyruvic Transaminase
(E.C:2.6.1.2) : Formal Genetics and Linkage Relations.
Humangenetik 13, 358 - 359
- 24) KÖMPF, J., 1971: Population genetics of soluble glutamic-
pyruvic-transaminase (E.C:2.6.1.2) : gene frequencies in
Southwestern Germany. Humangenetik 14, 76 - 77
- 25) KÖMPF, J., 1972: Zytoplasmatische Glutamat-Pyruvat-Transaminase
(E.C:2.6.1.2) : Bestimmungstechnik. Ärztl. Lab. 18, 25 - 26
- 26) LANDSTEINER, K., 1901: Über Agglutinationserscheinungen
normaler menschlicher Blute. Wien.Klin.Wschr. 14, 1132
- 27) LANDSTEINER, K., und P.LEVINE, 1927: A new agglutinable faktor
differentiating individual human bloods. Proc.Soc.exp.Biol.,
N.Y., 24, 600
- 28) LANDSTEINER, K., und A.S.WIENER, 1940: An agglutinable faktor
in human blood recognized by immune sera for rhesus blood.
Proc.Soc.exp.Biol., N.Y., 43, 223
- 29) LATTES, L., 1925: Die Individualität des Blutes (aus dem
Italienischen übersetzt und ergänzt v. FRITZ SCHIFF), Springer,
Berlin
- 30) LEHR, H., 1930: Über gruppenspezifische Eigenschaften des
menschlichen Speichels. Zschr.Immunit.forsch. 66, 175
- 31) LEVINE, P., E.M.KATZIN und L.BURNHAM, 1941: Isoimmunization
in pregnancy, its possible bearing on the etiology of
erythroblastosis fetalis. J.Amer.Med.ass. 116, 825
- 32) LEVINE, P., BACKER, MAY, M.WIGOD und R.PONDER, 1949: A new
human hereditary blood property (Cellano) present in
99,8 % of all bloods. Science 109, 464
- 32a) LÖHR, G.W., und H.D.WALLER, 1962: Erythrozytenfermente.
In R.KEPP und G.OEHLERT (Hrsg.): Blutbildung und Blut-
umsatz beim Feten und Neugeborenen. Beih. Z. Geburtsh.
Gynäk. 159, 119
- 33) MAYR, W., 1972: Die Genetik des HL-A-Systems. Humangenetik 12,
200 - 201

- 34) MEERA KHAN, P., 1972: Multiple loci glutamatic pyruvic transaminase of man: their linkage relationships in man-Chinese hamster cell hybrids. *Conf. Curr. Aspects Somat. Cell Genet. Freiburg* 17.-22.7.1972
- 35) MILGROM, F., ST. DUBISKI und G. WOŽNICZKO, 1956: Human sera with "Anti-Antibody". *Vox Sanguinis* 1, 172
- 36) MOURANT, A. E., 1946: A new human blood group antigen of frequent occurrence. *Nature* 158, 237
- 37) PÄUTAU, K., 1924: Eine neue χ^2 -Tabelle. *Z. Induct. Abstammung- und Vererbungslehre* 80, 558 - 564
- 38) PROKOP, O., 1971: Die menschlichen Blut- und Serumgruppen
Edt. Stuttgart
- 39) RACE, R. R., and R. SANGER, 1962: *Blood Groups in Man*.
Blackwell, Oxford
- 40) RITTER, H., 1971: Neue Enzym polymorphismen. Vortrag auf der
3. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde,
Mainz 11.-13. Okt. 1971
- 41) ROPARTZ, C., L. RIVAT et J. LENOIR, 1960: Fréquence des facteurs
 Gm^a , Gm^b , Gm^x , Gm -like et In_v chez 400 Noir africains.
Rev. fr. Études Clin. et Biol. 5, 814
- 42) ROPARTZ, C., L. RIVAT und P.-Y. ROUSSEAU, 1962: Deux nouveaux
facteurs héréditaire dans les systems héréditaires de
gamma-globulines, le $Gm(e)$ et $Inv(1)$. *Proc. Ninth Congr. Intern. Soc. Blood Transfusion*, 54
- 43) RUPPIN, H., 1968: Die Genfrequenzen im MNSs-System bei der
hessischen Bevölkerung unter besonderer Berücksichtigung
von weiteren Allelen am Ss-Locus. Inaugural-Dissertation
Frankfurt
- 44) SMITHIES, O., und N. F. WALKER, 1955: Genetical control of
some serum proteins in normal human serum. *Nature* 176, 1265
- 45) SMITHIES, O., 1956: Notation for serum-protein groups and
the genes controlling their inheritance. *Nature* 178, 694
- 45a) van SOMMERAN, H., 1972: Gene linkage and localization
studies in man-Chinese hamster somatic cell hybrids:
linkage between human lactate dehydrogenase and glutamatic
pyruvic transaminase loci in man-Chinese hamster somatic
cell hybrids. *Conf. Curr. Aspects Somat. Cell. Genet.*
Freiburg 17.-22.7.1972

- 46) SONNEBORN, H.-H., 1971: Nachweis von Isoenzym polymorphismen mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese. Ber.Ges. Forens. Blutgruppenk. 3, 211 - 219
- 47) SPEISER, P., und W.E.JANCIK, 1952: Zahlenwerte über die Wahrscheinlichkeit von Vaterschaftsausschlüssen bei Kenntnis erblicher Blutkörperchenmerkmale von Mutter und Kind. Wien.Springer
- 48) SPENCER, N., und D.A.HOPKINSON, H.HARRIS, 1969: Further data on the adenosine desaminase (ADA) polymorphism and a report of a new phenotype. Ann.hum. Genet. 32, 361-367
- 49) SPIELMANN, W., und P.KÜHNL, 1972: Vortrag auf der 4. Tagung der Gesellschaft für forensische Blutgruppenkunde in Trier
- 50) WALLER, M.V., und J.H.VAUGHAN, 1956: Use of anti-Rh-sera for demonstrating agglutination activating faktor in rheumatoid arthritis. Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 92, 198
- 51) WALSH, R.J., and C.MONTGOMERY, 1947: A new human isoagglutinin subdividing the MN blood groups. Nature (Lond.) 160, 504
- 52) WALSH, R.J., C.MONTGOMERY, R.SANGER und R.R.RACE, 1948: An antibody which subdivides the human MN blood groups. Heredity 2, 131
- 53) YAMAKAMI, K., 1926: The individuality of semen, with reference to its property of inhibiting specifically isohemagglutination. J.Immunol. 12, 185

